

武蔵野大学学術機関リポジトリ Musashino University Academic Institutional Repository

# HPLCを用いる競走馬生体成分分析法の開発およびその応用

著者	森 美和子
学位名	博士（薬科学）
学位授与機関	武蔵野大学
学位授与年度	2015年度
学位授与番号	32680甲第26号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1419/00000224/">http://id.nii.ac.jp/1419/00000224/</a>

# 博 士 学 位 論 文

内容の要旨及び論文審査結果の要旨

第 14 号

2 0 1 6 年 3 月

武蔵野大学大学院

## は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条による公表を目的として、  
2016 年 3 月 18 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査の  
結果の要旨を収録したものである。

## 目 次

氏 名	学位記番号	学位の種類	論 文 題 目	(頁)
森 美和子	博士甲第26号	博士（薬科学）	HPLCを用いる競走馬生体成分分析法の 開発およびその応用	・・・ 1

氏 名	森 美 和 子
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	甲第 26 号
学位授与の日付	2016 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	HPLC を用いる競走馬生体成分分析法の開発およびその応用
論 文 審 査 委 員	主 査 武蔵野大学 教授 豊 島 聡 副 査 武蔵野大学 教授 川 原 正 博 副 査 武蔵野大学 教授 小 野 秀 樹

## 論文内容の要旨

競馬においては、血統が重要視され、潜在的な競走能力に注目が集まっている。さらにその公正性を保ちつつ、競走馬の運動能力を高めることが重要である。そこで、本研究では、競走馬の運動能力に影響しうる血液中の生体成分の定量分析法の確立を試みた。

現在のドーピング検査では、血液あるいは尿中の禁止薬物自体もしくはその代謝物を検出・判定に利用しているが、近年アナボリックステロイドなど、体内から薬物が消失した後も薬効が残る薬物の使用が問題となっている。そこで本研究では、血漿プロテオミクスを用いる新規ドーピング検査法の開発を目的として、サラブレッドに薬物を投与し、その前後の血漿タンパク質の変動を我々が開発した Fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (FD-LC-MS/MS) 法を用いて解析することを試みた。この際、プロテオミクス測定妨害となるアルブミン除去前処理法を重点的に検討した。次いで、薬物投与後の血漿タンパク質変動を解析し、ドーピング検査への適用の可

能性を検討した。

さらに、血漿中に存在する低分子量成分であるカルノシン (N- $\beta$ -alanyl-L-histidine) に着目した。カルノシンは脊椎動物の筋肉や脳内 (嗅球) に豊富に含まれる水溶性のジペプチドであり、抗酸化作用や抗クロスリンク作用等の有用な作用を持つことが知られている。カルノシンは運動時に増加する乳酸による pH 低下を防ぐ働きがあり、ウマ、犬、回遊魚などの筋肉中で特に多いことから、運動能力と関係していることが考えられている。そこで、HPLC を用いるカルノシン及びそのアナログの簡便な分析方法を開発し、サラブレッド筋肉中カルノシンの定量を行った。

## 1. プロテオーム解析

### 1-1. 前処理法の検討

血漿プロテオミクスにおいては、多量に存在するアルブミン等のタンパク質が、変動する微量タンパク質の検出の妨げとなる。特に FD-LC-MS/MS 法ではタンパク質のシステイン残基と反応する DAABD-C1 を用いて蛍光ラベルを行うため、システインを多く含むアルブミンの除去が重要である。そこで、まず前処理法を検討した。その結果、等電点電気泳動の原理をもとにした OFFGEL<sup>®</sup> 法 (Agilent 社) では非特異的吸着のためタンパク質が検出されず、分取 SDS-PAGE をもとにした NATIVEN<sup>®</sup> 法 (ATTO 社) ではアルブミン除去の再現性が悪く、ゲルの作製や操作に長時間 (約 6 時間) 必要であるという欠点があり、血漿プロテオミクスの前処理に不向きであることが判明した。そこで磁気ビーズを使ったアルブミン除去キット Promax Albumin Removal kit (Polysciences 社) を用いて検討した結果、簡便かつ短時間でアルブミンを除去することが可能であることが判明した。

### 1-2. キシラジン投与サラブレッド血漿のプロテオーム解析

次に、モデル薬物としてキシラジンを用いてプロテオーム解析による新規ドーピングテストの可能性を検討した。キシラジンは  $\alpha 2$  受容体作動薬として競走馬の麻酔、鎮静に用いられており、キシラジン (1.0 mg/体重 kg、静注) 投与後、3 時間から経時的に血中濃度が減少し、9 時間後にはほぼ完全に消失することを既に確認している。そこで、投与前、投与 3 時間後、48 時間後および 120 時間後の血漿 (n = 3) を採取し、アルブミン除去前処理を行い、発蛍光試薬 DAABD-C1 でラベル化した後、HPLC で分離定量した。本実験は日本獣医生命科学大学倫理委員会の承認のもとで実施した。

キシラジン投与 48 時間後のサラブレッド血漿のクロマトグラムを図 1 に示す。投与前の

血漿と比較すると、3 - 48 時間後ではピーク 1 - 4 が有意に変動していることが判明したため、これらを分取し、トリプシン消化後、nanoHPLC-MS/MS を用いてさらに詳細に分析し、タンパク質データベース (MASCOT) を用いてその構造を明らかにした。その結果、ピーク 1 - 4 は各々 haptoglobin、 $\beta$ -2-glycoprotein 1、ceruloplasmin および  $\alpha$ -2-macroglobulin-like であることが判明した。経時的に観察した結果、haptoglobin、 $\beta$ -2-glycoprotein 1 および  $\alpha$ -2-macroglobulin-like は投与後 3 時間で微増した後、48 時間後には haptoglobin は  $2.23 \pm 0.42$  倍、 $\beta$ -2-glycoprotein 1 は  $1.23 \pm 0.06$  倍、 $\alpha$ -2-macroglobulin-like では  $10.70 \pm 4.27$  倍に有意に増加し、一方、ceruloplasmin は投与後 3 時間で  $1.72 \pm 0.22$  倍に有意に増加した後、減少することが判明した。

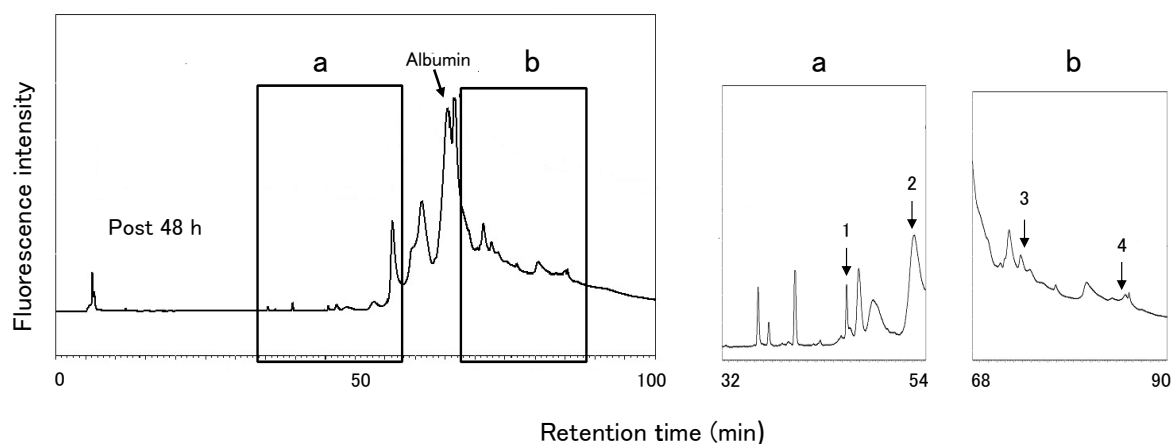


図 1 キシラジン投与 48 時間後のサラブレッド血漿を処理したクロマトグラム

(a: Retention time 32–54 min, b: Retention time 68–90 min)

#### HPLC 条件

カラム: Phenomenex Aeris Wide Pore 3.6  $\mu$ m C4 column (250  $\times$  4.6 mm i.d.),  
40°C

移動相: (A) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (90:9.0:1.0:0.10, v/v/v)

(B) water-acetonitrile-isopropanol-TFA (30:69:1.0:0.10, v/v/v)

グラジェント条件: 5.0% B held for 5.0 min; to 90% B in 100 min. 流速: 0.40  
mL/min

波長: ex 395 nm, em 505 nm

今回キシラジンの投与により変動したタンパク質のうち 3 つ (haptoglobin、

ceruloplasmin および  $\alpha$ -2-macroglobulin-like) は急性期タンパク質であり、 $\beta$ -2-glycoprotein 1 は血液凝固因子の活性化を阻止する糖タンパク質である。キシラジンはラットやヒツジで肺に炎症を起こすとの報告があり、サラブレッドにおいても、炎症が生じた結果として、薬物が血中から消失した後でも急性期タンパク質の変動が生じている可能性が示唆された。これらの結果は、薬物投与によるバイオマーカー検出の可能性を示したものであり、本手法が新規ドーピングテストに応用し得ることを示唆している。

## 2. カルノシンの濃度測定

### 2-1. HPLC 条件の検討

サラブレッド筋肉中のカルノシンを測定するため、HPLC の条件検討を新たに行った。これまでカルノシンの測定には、ODS カラムが汎用されていたが、カルノシンおよび類縁物質のアンセリン (図 2) の両者が分離せず、誘導体化の必要性があることから、順相カラム Hypercarb に変更し、それに伴い移動相を検討した。クロマトグラムを図 2 に示す。この結果 10 分以内で測定可能な条件を確立した。

### 2-2. 前処理法

サラブレッド 8 頭 (牡馬 5 頭、去勢馬 1 頭、牝馬 2 頭、3 - 5 歳) から屠殺後、5 部位の筋肉 (咬筋、橈骨手根屈筋、上腕三頭筋、胸鎖乳突筋および中臀筋) および肝臓や胃等の臓器を採取した。各部位の 3 箇所から均等に約 1 cm<sup>3</sup> の破片を採取後混合し、試料とした。組織約 50 mg を分取し、1 mL の精製水を加え、ホモジナイズを行い、95°C で 30 分間加温した。20,000g で 60 分間遠心後、上清 20  $\mu$ L を HPLC にて分析した。ホモジナイズ後のサンプル処理液にカルノシンの標準品を添加して回収率を測定した結果、回収率は  $98.8 \pm 6.8\%$  ( $n = 15$ ) であった。

### 2-3. 筋肉内のカルノシン濃度

筋肉以外の臓器からはカルノシンは検出されなかった。様々な部位の筋肉中のカルノシンの濃度を測定した結果、咬筋  $2.0 \pm 0.8$  mg/g (wet weight)、橈骨手根屈筋  $3.3 \pm 1.1$  mg/g、上腕三頭筋  $4.1 \pm 1.0$  mg/g、胸鎖乳頭筋  $5.3 \pm 0.5$  mg/g および中臀筋  $6.4 \pm 1.5$  mg/g であった。サラブレッドの筋肉繊維タイプには Type I (遅筋)、Type IIa および Type IIx (速筋) が存在するが、このうち最もカルノシン濃度の高い中臀筋は、速筋である Type IIa および Type IIx の割合が高いことが報告されており、一方カルノシン濃度が低い咬



筋では Type IIa および Type IIx の割合が低いことが報告されていることから、カルノシン濃度と筋肉繊維タイプの割合に関連があることが示唆された。

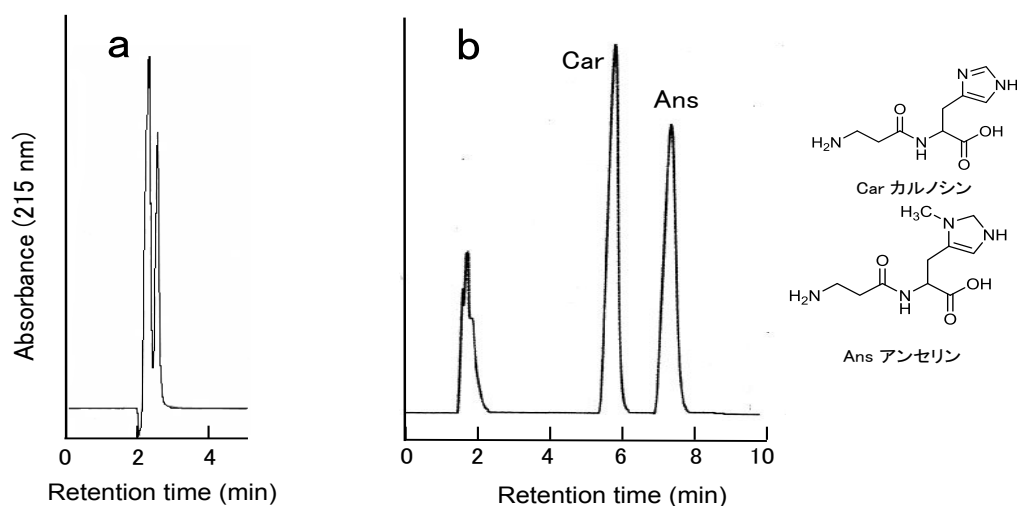


図 2 カルノシン類縁体の HPLC による分離

a: ODS カラムを使用 (移動相: 0.1% TFA aq.)

b: Hypercarb カラムを使用 (移動相: water-acetonitrile-TFA (93:7.0:0.10, v/v/v))

HPLC 条件

流速: 1.0 mL/min, 室温

UV 波長: 215 nm

### 3. 結論

プロテオーム解析による新規ドーピングテストの可能性を検討するために、モデル化合物としてキシラジンを投与した血漿中のタンパク質の変動を FD-LC-MS/MS 法により解析した結果、薬物が血中から消失した後でも 4 種類のタンパク質が有意に変動していることを明らかにし、プロテオーム解析による競走馬のドーピング検査への応用の可能性が示唆された。今後、ドーピング検査への応用のため、アナボリックステロイドなどさらに多くの薬物を用いて、より詳細に解析する必要がある。一方、HPLC を用いたサラブレッド筋肉中カルノシンの定量に関する研究では、筋肉中のカルノシン濃度と筋肉繊維タイプの割合に関連があることが示唆された。今後は血液中のカルノシン濃度を測定し、運動能力との関連を調査することが望まれる。

## 論文審査結果の要旨

申請者は、競走馬の運動能力と関連する生体成分の影響について検討し、その分析法を開発してきた。まず、競走馬の禁止薬物の使用を判定するドーピング検査法に対して Fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (FD-LC-MS/MS) 法を用いるプロテオーム解析法の応用について検討した。その過程で必要とされる血漿の前処理法、HPLC の条件検討等を行った後、モデル薬物であるキシラジンを用いて検討した結果、薬物が結晶から消失した後も、タンパク質の変動を解析することが可能であることが判明した。この結果から、プロテオーム解析法を用いて血漿中タンパク質をドーピングのバイオマーカーとして用いる可能性が示唆されたことになり、萌芽的ではあるが社会的重要性も大きい。また、申請者は競走馬の運動能力に関連する低分子量成分であるカルノシンに着目し、筋肉中の含量を簡便に定量分析できる方法を開発した。この方法を用いて、ウマ筋肉中のカルノシン含量の分析を行った結果、筋肉部位によって大きく異なることが判明した。これは筋繊維タイプによってカルノシン含量が異なることを示唆しており、ウマの運動能力を推定できる可能性が示された。また、本法は、食品中のカルノシン及び類縁体分析法としても重要であると考えられる。

申請者は、本研究題目の結果を 4 報の英文査読誌（うち 3 報は第一著者）に発表しており、5 回の学会発表を行っている。また、論文内容および関連事項について、口頭試問を行った結果、適切な回答が得られている。審査の結果、申請者は博学博士の学位を授与されるに十分は学識と能力を持っていると判断する。